EFECTO DE LA OCITOCINA Y DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE EL FLUJO UNIDIRECCIONAL DE AGUA EN PIEL DE SAPO

GRACIELA ELSO (*), SONIA APUD y ALFREDO COVIELLO (**)
(Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán).

SUMMARY

The diffusional permeability to water (Pdif) was measured in toad skin using tritiated water. The effect of unstirred layers, previously described in the literature, was assessed, and increases in Pdif brought about by treatment with oxytocin and angiotensin II were demonstrated. It was also found that theophylline, an inhibitor of the enzyme phosphodiesterase, also increases Pdif in this preparation, thus providing additional evidence of the involvement of cyclic AMP in the effects of these hormonal agents on water permeability.

La permeabilidad de las membranas de anfibios al agua ha sido el objeto de diversos estudios, basados en la determinación de los flujos netos y unidireccionales a través de estos tejidos.

Los valores obtenidos experimentalmente muestran diferencias entre la permeabilidad osmótica (Posm) y difusional (Pdif) con los valores obtenidos teóricamente; estas discrepancias podrían tener su origen en: la complejidad de las membranas biológicas, la resistencia que ofrece a la difusión el tejido de sostén y la presencia de capas no mezcladas de la solución adyacente a la membrana (Parisi y Piccinni, 1973).

Numerosos estudios han demostrado el papel de las hormonas neurohipofisiarias en la Posm en membranas de anfibios (Bently, 1958, Orloff y Handler, 1964, Jard 1971). Los resultados obtenidos con dichas hormonas sobre la Pdif, difieren según se estudien en vejigas urinarias de sapos o en piel de rana. En las primeras, Hays y Leaf (1962) han obtenido la duplicación de los valores basales de la Pdif, en presencia de la hormona, mientras que en piel de rana no se obtiene ninguna modificación (Dainty y House, 1966).

(*) Becaria de perfeccionamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

(**) Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET y Director del Instituto de Fisiología, F. de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán.

Por otro lado, se ha demostrado que la angiotensina II (AT_{II}) incrementa la Posm en piel de sapo (Coviello y Brauckmann, 1973). Con el objeto de aportar nuevas evidencias sobre los efectos de una hormona neurohipofisiaria (ocitocina, Oc) y la AT_{II} sobre la permeabilidad difusional en piel aislada de sapo se realizó el presente estudio en el que se midió el flujo unidireccional de agua, mediante el uso de agua tritiada (THO).

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron sapos *Bufo arenarum* de ambos sexos, los que fueron hidratados en agua corriente, en recipientes individuales, 24 horas antes del experimento, a temperatura ambiente. Una vez desmedulados y descerebrados se disecó la piel ventral de la zona pélvica, se la lavó en solución de Ringer y se procedió a montarla en tubos plásticos adaptados a tal fin, con la epidermis hacia el lado externo. De cada animal se obtuvieron dos preparados simétricos, control y experimental. Cada preparación fue colocada en un baño externo individual de 15 ml de solución de Ringer isotónico, colocando como baño interno 1,5 ml de la misma solución. El período de equilibración fue de 60 minutos durante el cual se procedió a cambiar ambos baños por otros de idéntica composición. Seguidamente se comenzó el período experimental que fue de 20 min para los estudios con Oc y AT_{II} y de 40 min en el caso de la teofilina, cambiándose el baño interno con una solución de Ringer que contenía la droga a probar (experimentales) o por una solución de Ringer solo (controles). Cumplido el período de incubación, cada preparado fue secado por contacto con papel de filtro y colocado durante un min en una solución de Ringer que contenía THO (1 μCi/ml), la cual fue agitada mediante un agitador magnético (210 rpm). El contenido del baño interno fue inmediatamente vertido en un recipiente de boca ancha, vacío, previamente pesado, a los efectos de poder conocer el volumen total del baño interno. Luego se tomaron muestras de 0,5 ml de dicho baño, las que se contaron en un contador de centelleo líquido (Beckman, LS–100 C). El líquido de centelleo era una mezcla de PPO, naftaleno y dioxano. En las mismas condiciones se contaron muestras tomadas del baño externo, para determinar la actividad específica del mismo. En todos los casos se mantuvo un error de 3 % en el contaje.

La solución de Ringer utilizada es similar a la de otros trabajos (Coviello y Brauckmann, 1973), la osmolaridad 210–220 mOsm/kg de agua, el pH fue ajustado a 7,4–7,6.

Las drogas usadas fueron ocitocina sintética (Syntocinon SANDOZ) en concentración final de 25 mU/ml ($5{,}5 . 10^{-8}$ M), angiotensina II (Hypertensin CIBA–GEYGI) y teofilina (CALBIOCHEM) en dosis de $2 . 10^{-7}$ y 10^{-2} M respectivamente.

Los resultados del flujo unidireccional así determinado fueron expresados en $\mu l . cm^{-2} . h^{-1}$. La significación estadística fue estudiada por un test de "t" para muestra pareadas.

RESULTADOS

1. *Determinación del flujo unidireccional de agua*

A los efectos de demostrar la validez del método empleado para estudiar la acción hormonal sobre la Pdif se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se compararon los flujos de agua (epidérmico a dérmico) obtenidos en condiciones basales, entre los dos preparados simétricos de un mismo animal. En la Figura 1 se presentan los valores promedios de 10 experimentos no existiendo diferencias significativas entre las mitades de piel ventral.

2. *Influencia de las "capas no mezcladas"*

Dainty y House (1966) investigaron la influencia de las capas no mezcladas presentes en las superficies adyacentes de la dermis y epidermis, en la determinación de los flujos de agua. Estos autores demostraron que al aumentar la velocidad de agitación del baño, aumentan los valores obtenidos de Pdif a través de la piel de rana. En las condiciones de los presentes experimentos se obtuvieron resultados similares a los citados, como puede observarse en la Figura 2 en la que se representan los promedios de 10 mediciones; un preparado fue colocado en un baño sin agitación y su par en otro con una velocidad de agitación de 305 rpm, durante el minuto de medición del flujo unidireccional.

3. *Efecto de la ocitocina*

En la Figura 3 se observa que las mitades incubadas con ocitocina presentan un incremento significativo del parámetro estudiado en relación a los controles.

4. *Efecto de angiotensina II*

La Figura 4 presenta los resultados de una serie de 8 experimentos realizados en el otoño, en los cuales puede verse que la AT_{II} actúa aumentando la Pdif de la piel del sapo. Resultados similares se obtuvieron en primavera, en una serie de experimentos efectuados en similares condiciones.

5. *Efecto de la teofilina*

Las pieles incubadas con teofilina durante 40 min presentan un aumento significativo de la Pdif sobre las mitades controles (Figura 5). El efecto de la teofilina es medido por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa efecto que incrementa el MAP cíclico tisular, el que sería el responsable final del aumento observado. Debido a que la concentración elevada de teofilina empleada (10^{-2} M) podría aumentar la osmolaridad del baño interno produciendo un gradiente osmótico capaz de afectar el parámetro estudiado, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se agregó al baño interno glucosa 10^{-2} M.

Los resultados, (Figura 6) muestran que este gradiente osmótico no reproduce el efecto observado.

DISCUSION

La piel aislada del sapo *Bufo arenarum* ha sido usada para medir la Posm con el objeto de determinar efectos hormonales, entre ellos el de la AT_{II} (Coviello, 1972). Sin embargo en la piel de esta especie no existe información sobre los valores de Pdif y su modificación por diversos agentes. Con este fin se adoptó la técnica de medición del flujo unidireccional de agua en períodos cortos de tiempo, descripta para la vejiga de sapo por Parisi y Piccininni (1973).

La medición de la Posm se realiza clásicamente por métodos gravimétricos o volumétricos no pudiendo usarse un indicador como el agua tritiada por el hecho sin explicación clara en la literatura hasta el momento, por el cual la Posm y la Pdif evidencian un comportamiento transepitelial diferente (Hays y Leaf, 192, Leaf y Hays, 1962, Hays y Franki, 1970).

En la metodología de la medición de la Pdif es crítica la agitación de las capas de agua en contacto con la membrana ("unstirred layers"). A este respecto debe mencionarse que la agitación modifica los valores basales en piel de rana (Dainty y Hous, 1966) lo que es confirmado por los resultados de los presentes experimentos aunque estos valores no son modificados en vejiga (Hays y Franki, 1970) por razones sin explicación hasta el momento. Por el contrario, mientras las hormonas neurohipofisiarias producen un aumento de la Pdif en vejiga de sapo (Hays y Leaf, 1962; Leaf y Hays, 1962; Hays y Franki, 1970; Parisi y Piccini, 1973), no se observa modificación alguna en piel de rana (Dainty y House, 1964). Los resultados obtenidos en los presentes experimentos demuestran que en la piel de sapo, la Oc produce, como en vejiga, un aumento de la Pdif que es el doble de la basal, aunque usando una dosis 2,5 veces mayor que la de Parisi y Piccini. Por otra parte, un efecto hormonal similar es también obtenido con AT_{II} en dosis 3,6 veces mayores sobre una base molar (2.10^{-7} M de AT_{II} y 5,5.10 M de Oc). Hays (1968) sostiene que este incremento en la Pdif obtenido con la vasopresina, se debería a que la misma provoca el aumento del número de poros de la barrera densa del borde luminal, de acuerdo a la teoría de las dos barreras en serie, una densa y otra porosa.

El hecho que la teofilina, inhibidor de la fosfodiesterasa, aumente la Pdif, evidencia que la Posm y la Pdif poseen un mecanismo inicial similar mediado por el AMP cíclico, el cual actuaría posteriormente en forma diferente sobre una y otra permeabilidad.

En el presente estudio se ha partido de la premisa que la Pdif en piel tiene un comportamiento similar al de vejiga reproduciendo la técnica usada por Parisi y Piccinni en este último tejido.

Una mejor aproximación en estas mediciones se obtendrá mediante una comprobación del tiempo mínimo de equilibración y una valoración del efecto de las capas no mezcladas del lado epidérmico.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con subsidios del CONICET (603b/75) y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la República Argentina. La angiotensina II (Hypertensin CIBA-GEIGY) fue donada por los Dres. P. Desaulles y K. Scheibli, (Basilea, Suiza).

BIBLIOGRAFIA

1. BENTLEY, P. J., 1960. The effects of neurohypophyseal extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*. J. Endocr., *17:* 201-209.
2. COVIELLO, A., 1972. Efecto de la angiotensina II en el metabolismo del sodio y del agua en los Anfibios. Tesis, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
3. COVIELLO, A. y BRAUCKMANN, E. S., 1973. Hydrosmotic effect of angiotensin II: Isolated toad skin. Acta physiol. latinoam., *23:* 18-25.
4. DAINTY, J. and HOUSE, C. R., 1966. An examination of the evidence for membrane pores in frog skin. J. Physiol. *185:* 172-184.
5. HAYS, R. M., 1968. A new proposal for the action of vasopressin, based en studies of complex synthetic membrane. J. Gen. Physiol. *51:* 385-398.
6. HAYS, R. M. and FRANKI, N., 1970. The role of water diffusion in the action of vaso pressin. J. Membr. Biol. *2:* 263-276.
7. HAYS, R. M. and LEAF, A., 1962. Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol. *45:* 921-932.
8. JARD, S., 1971. The mode of action of ADH. J. Physiol. (Paris), *63:* 99-146.
9. LEAF, A. and HAYS, R. M., 1962. Permeability of the isolated toad bladder to solute and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol. *45:* 921-923.
10. ORLOFF, J. and HANDLER, J. S., 1964. The cellular mode of action of antidiuretic hormone. Am. J. Med. *36:* 686-697.
11. PARISI, M. and PICCINNI, Z. F., 1973. The penetration of water into the epithelium of toad urinary bladder and its modification by oxytocin. J. Membr. Biol. *12:* 227-246.

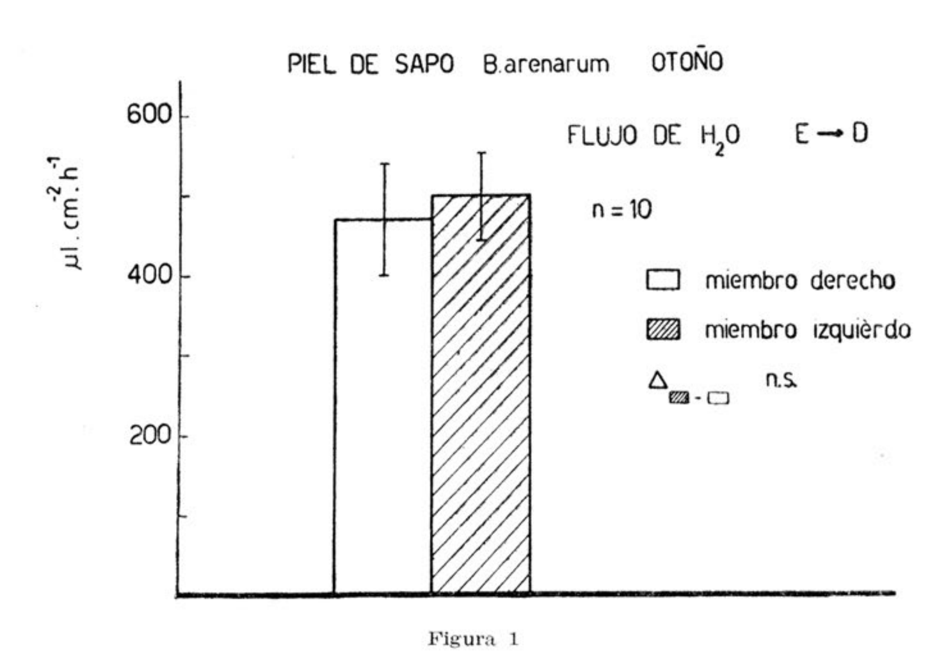


Figura 1

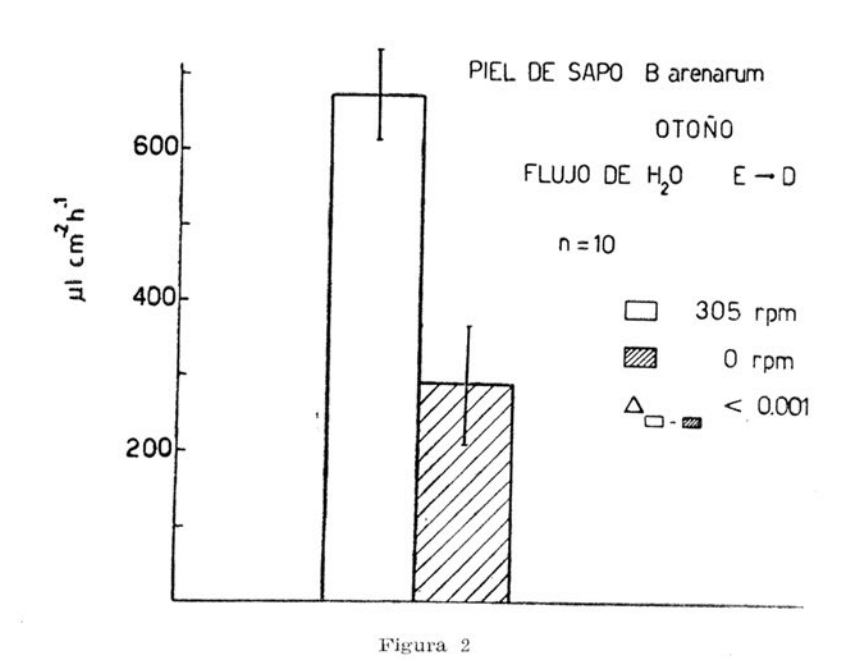


Figura 2

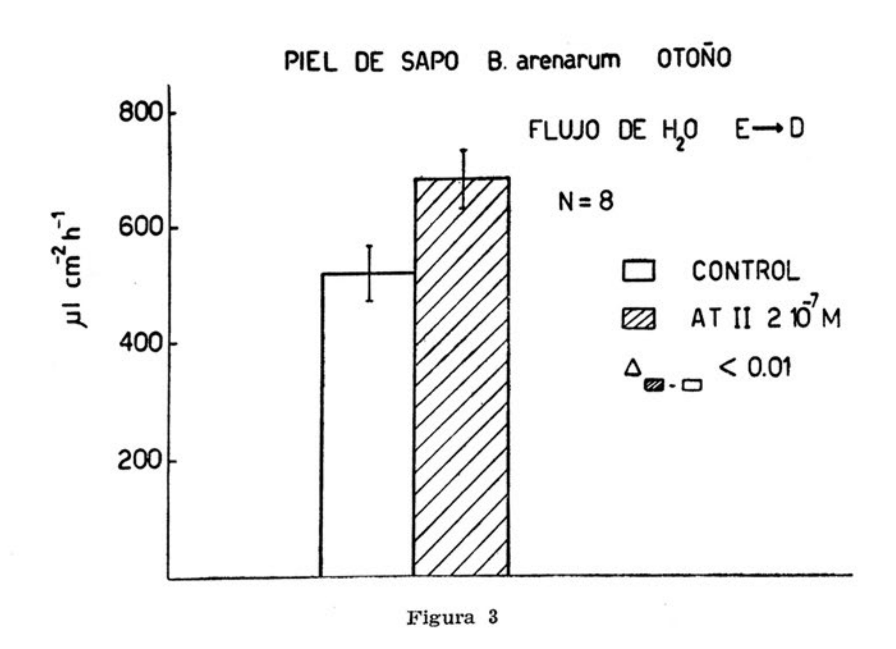


Figura 3

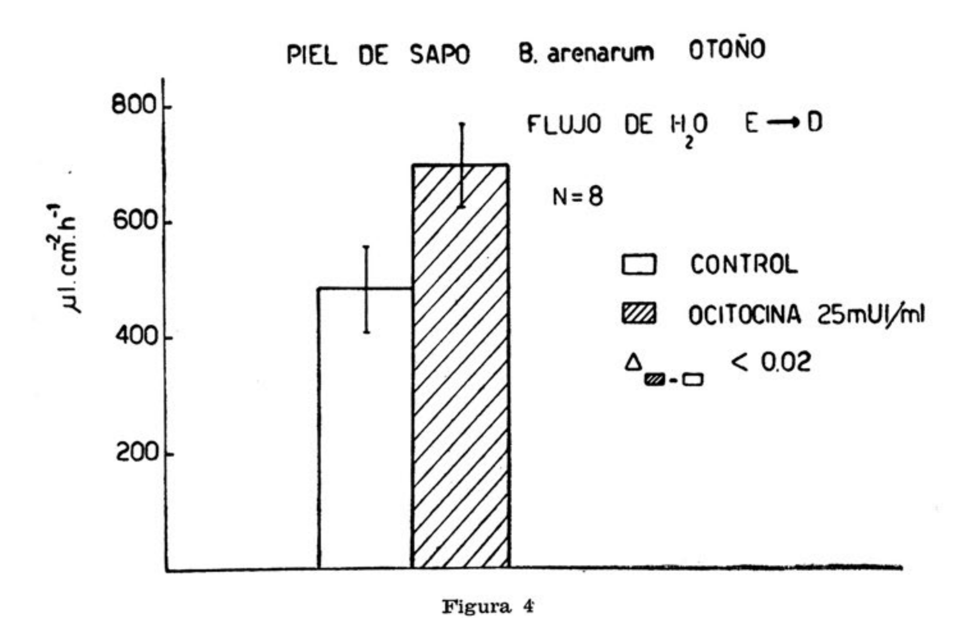


Figura 4

PIEL DE SAPO B. arenarum OTOÑO

FLUJO DE H_2O E → D

N = 6

CONTROL

TEOFILINA 10^{-2} M

Δ < 0.05

$\mu l.cm^{-2}.h^{-1}$

800
600
400
200

Figura 5

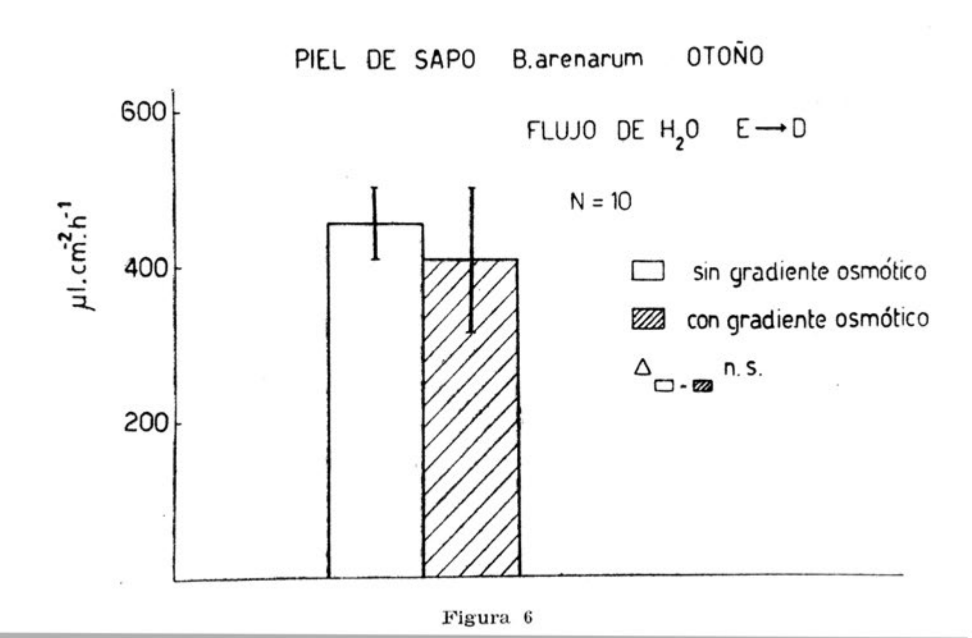


Figura 6